

УДК 593.195 + 576.893.19
© 1994

МИКРОСПОРИДИЯ NOSEMA GRYLLI N. SP. ИЗ СВЕРЧКА GRYLLUS BIMACULATUS

Ю. Я. Соколова, К. В. Селезнев, В. В. Долгих, И. В. Исси

Из сверчков описана новая микроспоридия рода *Nosema*, инвазирующая жировое тело всех стадий насекомых.

В лабораторной популяции сверчков *Gryllus bimaculatus* начиная с 1990 г. периодически отмечается эпизоотия микроспоридиоза. Было предпринято свето- и электронно-микроскопическое исследование обнаруженного вида микроспоридий, результаты которого представлены в настоящей статье.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Популяция двухпятнистого сверчка (*Gryllus bimaculatus* Deg.) содержалась в инсектарии Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова по методу группового культивирования в садках из органического стекла размером $0.25 \text{ м}^2 \times 0,4 \text{ м}$ с оптимальным соотношением параметров среды (Князев, 1985).

Больных микроспоридиозом насекомых, визуально отличающихся от здоровых увеличенным в размерах и мягким по консистенции брюшком, отбирали для последующего анализа. Отпрепарированное жировое тело использовалось для приготовления мазков для световой микроскопии и фиксировалось смесью 0.5%-го глутарового альдегида и 2%-го параформальдегида на фосфатном буфере для электронной микроскопии. Мазки фиксировали метанолом и окрашивали, по Романовскому-Гимза. Для ультраструктурного анализа образцы постфиксировали 1%-й четырехокисью осмия, обезвоживали в серии растворов этанола возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне, после чего заливали в эпон-аралдит.

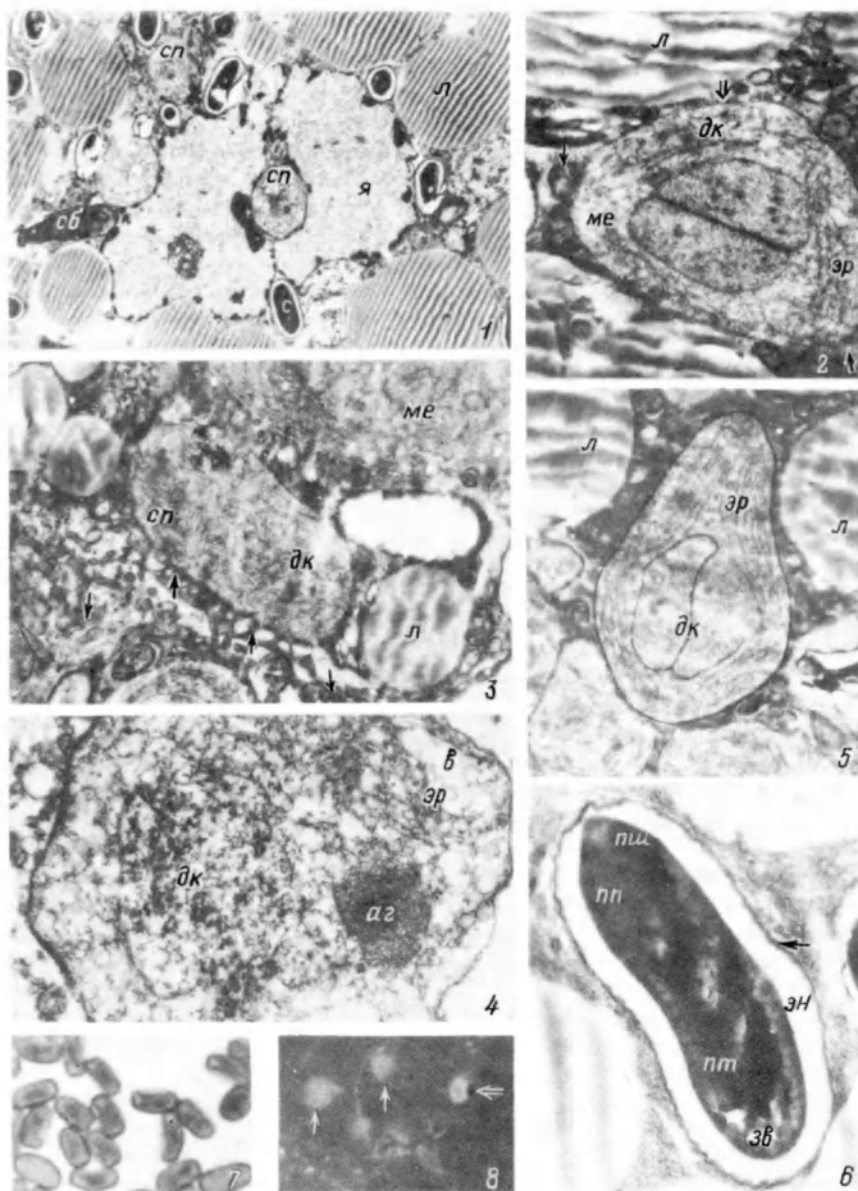
Срезы готовили на ультрамикротоме Reichert-Yung, контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца, просматривали в электронный микроскоп Hitachi H-300.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение ультратонкого строения микроспоридии из сверчков *Gryllus bimaculatus* показало, что по своим признакам она относится к новому виду рода *Nosema*.

Nosema grylli sp. n. (см. рисунок; вкл.)

Локализация: жировое тело, гонады.



Стадии развития *Nosema grylli*.

1 — участок жирового тела сверчка, зараженного *Nosema grylli*, ($\times 3000$); 2 — срез через поздний меронт, одиночной стрелкой указаны митохондрии клетки хозяина, окружающие паразита, двойной — пузырьки, отшнуровывающиеся от поверхности меронта ($\times 10\ 000$); 3 — стадии развития *N. grylli*, тубулярные структуры (стрелки) ($\times 10\ 000$); 4 — стадия развития *N. grylli*, переходная от меронта к споронту, электронноплотная оболочка (стрелка) сформирована лишь на отдельных участках поверхности паразита ($\times 15\ 000$); 5 — продольный срез через споронт ($\times 10\ 000$); 6 — срез через зрелую спору, экоспора отмечена стрелкой ($\times 20\ 000$); 7 — споры, окрашенные по Романовскому-Гилца ($\times 2000$); 8 — споры (двойная стрелка) с выброшенными полярными трубками и спороплазмами (одиночная стрелка), иммунофлуоресцентное окрашивание ($\times 890$).

АГ — аппарат Гольджи, в — вакуоль, дк — диплокарин, зв — задняя вакуоль, л — липидные гранулы, ме — меронт, пл — полярный пласт, пт — полярная трубка, пш — полярная шапочка, с — спора, св — споробласт, сп — споронт, эн — эндоспора, эр — эндоплазматический ретикулум паразита, я — ядро клетки хозяина.

Development stages of *Nosema grylli*.

ГИСТО- И ЦИТОПАТОЛОГИЯ

Жировое тело — основное место инвазии и размножения паразита, в норме желтоватого цвета и структурировано в виде лопастей. При заражении оно становится молочно-белым от накопившихся спор и распадается при малейшем прикосновении. При сильной инвазии различные стадии развития микроспоридий заполняют всю цитоплазму клетки, оставляя свободным лишь ядро и липидные гранулы (см. рисунок 1). В зараженных клетках наблюдается значительное число «миелиновых фигур» (концентрических мембранных контуров), а также появляется материал, заключенный в ограниченные мембраной трубчатые структуры — тубулы. В ряде случаев удается проследить связь тубул с поверхностью паразита (рис., 3). Стадии меро- и спорогонии паразита окружены митохондриями и шероховатым эндоплазматическим ретикулумом клетки хозяина (см. рисунок 2, 5).

Ультраструктура стадий развития

Все стадии развития: меронты, споронты, споробласты и споры развиваются в прямом контакте с клеткой хозяина и обладают диплокарионном. Размеры стадий приведены в табл. 1.

Меронты (см. рисунок, 2, 3) представляют собой округлые клетки, окруженные цитоплазматической мембраной. От поверхности мембраны часто отшнуровываются мелкие пузырьки. Диаметр меронтов на ультратонких срезах — 4.49 ± 0.18 мкм ($n = 13$). В цитоплазме меронтов различимы: центрально расположенный ядерный аппарат в виде диплокариона, цистерны эндоплазматического ретикулума, свободные рибосомы. Меронты активно делятся закрытым внутриядерным плевромитозом. При этом в профазе и анафазе в обоих ядрах диплокариона наблюдаются хромосомы с прикрепленными к ним микро-

Таблица 1

Размеры стадий развития *Nosema grylli*

Table 1. Dimensions of development stages of *Nosema grylli*

Стадии развития	Измерения стадий развития	<i>M</i>	<i>Se</i>	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>n</i>
Световая микроскопия						
Поздние меронты и споронты	Диаметр	5.2	0.27	3.7	8.1	21
	Длина	6.2	0.15	5.6	7	10
Споробласты	Ширина	2.3	0.1	1.9	3	9
	Длина	4.5	0.16	4	5.2	9
Споры	Ширина	2.2	0.07	1.8	2.5	9
Электронная микроскопия						
Меронты (поздние)	Диаметр	4.5	0.18	3.3	5.6	13
Споронты	Длина	4.7	0.17	4	5.8	12
	Ширина	3.6	0.19	2.2	4.8	12
Споробласты	Длина	5.7	0.14	5.3	6.1	5
	Ширина	2.1	0.08	1.9	2.3	5
Споры	Длина	3.3	0.06	3	3.6	9
	Ширина	1.4	0.07	1	1.8	9

Примечание. *M* — среднее значение признака, *Se* — стандартная ошибка средней, *min* и *max* — крайние значения признака, *n* — число измерений. Размеры стадий даны в мкм.

трубочкам веретена. Число хромосом в ядрах диплокариона не превышало 8. Ядерные поры, расположенные достаточно регулярно на ядерной оболочке в зоне контакта ядер диплокариона, лежат строго напротив друг друга. Мы не обнаружили меро- или спорогональные плазмодии, содержащие по несколько ядер.

Споронты (см. рисунок, 4, 5) характеризуются появлением электронно-плотной оболочки вокруг клетки. Оболочка откладывается дискретными участками сверху плазмалеммы (рис., 4). В то же время в цитоплазме появляется структура, состоящая из мелких везикул и напоминающая аппарат Гольджи других микроспоридий. Обычно споронты имеют слегка вытянутую форму. Их размеры — $4.73 \pm 0.17 \times 3.56 \pm 0.19$ мкм ($n = 12$). Цистерны ретикулума расположены упорядоченно: от одного полюса клетки к другому. Споронты делятся закрытым плевромитозом. Структура ядерного аппарата аналогична таковой предшествующей стадии. С начала спорогонии в клетках хозяина вокруг паразитов выявляется сеть тубулярных структур, заполненных электронноплотным веществом (рис., 3). По-видимому, появление таких структур связано с секреторной активностью паразита.

Споробласты (рис., 1) — это стадия развития, на которой осуществляются морфогенетические преобразования, ведущие к формированию структур зрелой споры. Размеры споробластов — $5.74 \pm 0.14 \times 2.12 \pm 0.08$ мкм ($n = 5$). Клетка паразита приобретает вытянутую форму, в цитоплазме появляются зачатки полярной трубки, полярного пласта, полярной шапочки и других структур аппарата экстрезии споры. Оболочка при этом сохраняет строение, характерное для споронты. Вероятно, в связи со структурными изменениями в оболочке на стадии споробласта паразит становится наиболее подверженным изменениям в ходе фиксации и проводки. Именно на этой стадии клетки паразита часто сжимаются, их внутренняя структура бывает плохо различима.

Споры *Nosema grylli* имеют овально-цилиндрическую форму (рис., 6, 7). Размеры живых спор — $4.5 \pm 0.16 \times 2.2 \pm 0.07$ мкм ($n = 9$), фиксированных — $3.33 \pm 0.06 \times 1.43 \pm 0.07$ мкм ($n = 9$). Свежевыделенные споры легко выбрасывают полярные трубки при подсыхании мазка. Длина полярной трубки достигает 200 мкм. Выброшенные спороплазмы имеют округлую форму (рис., 8). Внутренняя структура спор типична для представителей рода *Nosema*. Для нового вида характерны: центрально расположенный диплокарион, грибовидный полярный диск, плотно упакованный полярный пласт. Задняя вакуоль плохо сохраняется на срезах. Изофилярная полярная трубка уложена в 18—20 витков, часто расположенных на срезе в два слоя. Угол наклона передних витков к длинной оси равен 65—70°. Оболочка споры трехслойная. Толщина эндоспоры 0.3—0.5 мкм; экзоспоры 0.1—0.2 мкм.

ОБСУЖДЕНИЕ

Патология зараженной клетки

В отличие от большинства видов нозем местом первичной инвазии и образования спор *N. grylli* служит жировое тело сверчков. В кишечном эпителии, а также в эпителии мальпигиевых сосудов спор и других стадий паразитов обнаружено не было. Присутствие спор в гонадах как у самцов, так и у самок говорит о возможности трансгенитальной передачи паразита. Наличие в цитоплазме пораженной клетки хозяина трубчатых структур диаметром 60—150 нм, отходящих от поверхности меронтов и споронтов и распространяющихся по всей цитоплазме пораженной клетки, отмечалось и для других видов микроспоридий: для *Vairimorpha necatrix* из *Trichoplusia ni* (Darwish e. a., 1989), *Vairimorpha antheraeae* из *Barathra brassicae* (неопубликованные данные авторов), *Perezia dichroplusae* из аргентинского кузнечика *Dichroplus elongatus* (Lange, 1987),

Nosema acridophagus из кузнечика *Melanoplus sanguinipes* (Street, Henry, 1993). Общим для всех вышеперечисленных видов микроспоридий является локализация в жировом теле хозяина. Возможно, сеть трубчатых структур есть некая ответная реакция клетки жирового тела на инвазию, индуцированная или извращенная паразитом и используемая им для своих потребностей (например, питания). Только дальнейшие цитохимические и иммуноцитохимические исследования смогут объяснить происхождение и функциональный смысл этого явления.

Несмотря на интенсивное заселение паразитами клеток жирового тела, мы не наблюдали в последних исчезновения жировых гранул, как это отмечалось при паразитировании *Nosema mesnili* в *Pieris brassicae* или *V. necatrix* в *T. ni*. (Соколова и др., 1985; Darwish e. a., 1989).

Таксономия

К настоящему времени известно 6 видов микроспоридий из прямокрылых: *Nosema locustae* (Canning, 1962); *N. acridophagus* (Henry, 1967; Street, Henry, 1993), *N. cuneatum* (Henry, 1971), *N. maroccanus* (Крылова, Нуржанов, 1987), *Perezia dichroplusae* (Lange, 1987), *N. pyrgomorphae* (Toguebaye e. a., 1988; Lange e. a., 1993). Все эти микроспоридии — паразиты короткоусых прямокрылых. Первые пять — представители семейства Acrididae; последний — сем. Pyrgomorphidae. Морфологические характеристики этих видов, важные для систематики, приведены в табл. 2. По форме и морфологии спор описываемый вид наиболее близок в виду *N. pyrgomorphae*, однако легко отличим от него более

Таблица 2
Микроспоридии из прямокрылых (Orthoptera)

	Виды микроспоридий						
	<i>Nosema locustae</i>	<i>N. acridophagus</i>	<i>N. cuneatum</i>	<i>Perezia dichroplusae</i>	<i>N. maroccanus</i>	<i>N. pyrgomorphae</i>	<i>N. grylli</i> sp. n.
Источник информации	Canning, 1953, 1962	Henry, 1967	Henry, 1971	Lange, 1987	Крылова, Нуржанов, 1987	Toguebaye e. a., 1987	настоящая статья
Насекомые-хозяева	<i>Locusta migratoria migratorioides</i>	<i>Shistocerca americana</i> , <i>Melanoplus</i> spp.	<i>Melanoplus sanguinipes</i> , <i>M. confusus</i>	<i>Dichroplus elongatus</i>	<i>Dociosaurus maroccanus</i>	сем. Pyrgomorphidae	<i>Gryllus bimaculatus</i>
Локализация, симптомы	генерализованная; потемнение брюшка	генерализованная; образование нодул	генерализованная; меланизация	мальпигиевы сосуды	генерализованная; потемнение брюшка	гонады, слюнные железы, кишечник, жировое тело	жировое тело, гонады; вздутие брюшка
Число ядер в споре	ДК	ДК	ДК	одно	ДК	ДК	ДК
Число витков ПТ	?	?	10—12	более 8	14—15	7—9	18—20
Форма спор	овальная	яйцевидная	яйцевидная	овально-цилиндрическая	широко-яйцевидная	цилиндрическая	овально-цилиндрическая
Размеры спор (мкм)	4—6.6 × 2.5—3.5	3.5—5 × 2.2—3	3.5—4 × 2.5—3	1.6—6.7 × 1—2.1	4.4—5.0 × 2.5—3.8	3.4—3.8 × 1.2—2	4—5.2 × 1.8—2.5

Примечание. ДК — диплокарион; ПТ — полярная трубка.

крупными спорами, иной их формой (они менее вытянуты) и большим числом витков полярной трубки. На основании указанных отличий и выделяется новый вид. Он, несомненно, относится к роду *Nosema*, так как обладает диплокарионом на протяжении всего жизненного цикла, апанспоробластичен и мономорфен. Это первая находка микроспоридий у представителей сем. Gryllidae и вообще у прямокрылых подотряда Dolichocera.

Диагноз вида *Nosema grylli* n. sp.

Микроспоридия, паразитирующая в живом теле сверчков *Gryllus bimaculatus*, образует споры овально-цилиндрической формы размером $4.5 \pm 0.16 \times 2.2 \pm 0.07$ мкм с 18—20 витками полярной трубки, расположенными в два слоя.

Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам лаборатории электронной микроскопии НИИ сельскохозяйственной лаборатории (Санкт-Петербург—Пушкин) за обеспечение прекрасных условий работы; научным сотрудникам ИЭФиБ РАН Г. Б. Белостоцкой и И. В. Шемаровой за помощь в проведении иммунофлюоресцентного теста; заведующей инсектария ИЭФиБ О. А. Антоновой за предоставление живого материала и ценные советы. Исследование выполнено частично за счет гранта Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ, № 94—04—12972).

Список литературы

- Князев А. Н. Цикл развития сверчка *Gryllus bimaculatus*, 1985 Deg. (Orthoptera, Gryllidae) в условиях лабораторного содержания // Энтومол. обозр. 1985. Т. 64, вып. 1. С. 58—73.
- Крылова С. В., Нуржанов А. А. Микроспоридия *Nosema maroccanus* sp. n. (Nosematidae) из марокканской саранчи *Dociostaurus maroccanus* (Thunb.) (Orthoptera) // Бюл. ВИЗР. 1987. № 68. С. 10—15.
- Соколова Ю. Я., Тимошенко С. А., Исси И. В. Ультраструктурные изменения в жировом теле гусениц *Pieris brassicae* L., связанные с заражением насекомом микроспоридией *Nosema mesnili* Paillot // Тез. докл. «Методика и результаты изучения физиологического состояния насекомых». Тарту, 1985. С. 106—109.
- Canning E. U. A new microsporidian *Nosema locustae* sp. n. from the fat body of the African migratory locust *Locusta migratoria migratorioides* (R. et F.) // Parasitology. 1953. Vol. 43, N 3, P. 287—290.
- Canning E. U. The life cycle of *Nosema locustae* Canning in *Locusta migratoria*, and its infectivity to other hosts // J. Insect Pathol. 1962. Vol. 4, N 2. P. 237—247.
- Darwish A., Weidner E., Fuxa J. *Vairimorpha necatrix* in Adipose Cells of *Trichoplusia ni* // J. Protozool. 1989. Vol. 36, N 3. P. 308—311.
- Henry J. E. *Nosema acridophagus* sp. n., a microsporidian isolated from grasshoppers // J. Invertebr. Pathol. 1967. Vol. 9, N 3. P. 331—341.
- Henry J. E. *Nosema cuneatum* sp. n. (Microsporida: Nosematidae) in grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) // J. Invertebr. Pathol. 1971. Vol. 17, N 2. P. 164—171.
- Lange C. E. A new species of *Perezia* (Microsporida: Perezidae) from the Argentine grasshopper *Dichoplus elongatus* (Orthoptera: Acrididae) // J. Protozool. 1987. Vol. 34, N 1. P. 34—39.
- Lange C. E., Brito J. M., Henry J. E. Characteristics of a Microsporidium (Protozoa: Microsporida) infecting Grasshoppers (Orthoptera: Pyrgomorphidae) in Cape Verde, Africa // J. Protozool. 1993. Vol. 39, N 4. P. 494—498.
- Street D. A., Henry J. E. Ultrastructural investigation of the microsporidian *Nosema cuneatum* (Microsporida: Nosematidae) in the grasshopper *Melanoplus sanguinipes* // Protistologia. 1987. Vol. 23, N 1. P. 18—27.
- Street D. A., Henry J. E. Ultrastructural study of *Nosema acridophagus* Henry (Microsporida: Nosematidae) from a grasshopper // Parasitology Res. 1993. Vol. 79, N 3. P. 173—177.
- Toguebaye B. S., Seck A., Marchand B. Histopathologie et Ultrastructure de *Nosema pyrgomorphae* n. sp. (Microsporida, Nosematidae) Parasite de *Pyrgomorpha conica tetricornis* (Orthoptera, Pyrgomorphidae) // Arch. Protistenk. 1988. Bd 136. S. 283—292.

Всероссийский Научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург—Пушкин

Поступила 26.05.1994

MICROSPORIDIA *NOSEMA GRYLLI* N. SP. FROM THE CRICKET *GRYLLUS BIMACULATUS*

Yu. Ya. Sokolova, K. V. Seleznirov, V. V. Dolgikh, I. V. Issi

Key words: Ultrastructure, Microsporidia from Orthoptera, *Nosema*.

SUMMARY

A new species of microsporidia has been described from the laboratory population of *Gryllus bimaculatus* using light and electron microscopy. All stages of parasite life cycle have been examined. Characteristic features (nuclei in diplokariotic arrangement, direct contact of all developmental stages with host cell cytoplasm, disporoblastic type of development, ultrastructural details of the spore extrusion apparatus) indicate on the position of the species studied inside the genus *Nosema*. Large number (18—20) of polar filament coils arranged in two layers, intensive secretory activity on prespore stages in combination with some other features differ *Nosema grylli* from other nosems. This microsporidia is the first one discovered in crickets (Gryllidae). Comparative review of microsporidia species infective for Orthoptera is given.